



REC'D 25 MAY 2004

WIPO PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0002314
Application Number

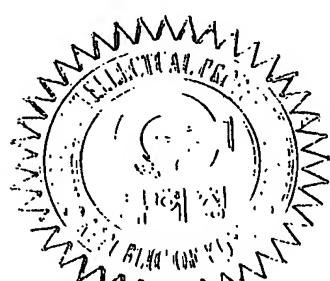
출원년월일 : 2003년 01월 14일
Date of Application

출원인 : 학교법인연세대학교
YONSEI UNIVERSITY
Applicant(s)

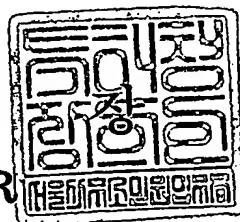
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004년 05월 13일



특허청
COMMISSIONER





000003208



101110100000000000000000



0000284500

방식 심사 관	담당	심사관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.01.14

【발명의 국문명칭】 외벽에 반투막이 형성된 생분해성 이중 다공성 스캐폴드 및 이를 이용한 조직세포 배양방법

【발명의 영문명칭】 Biodegradable Dual Porous Scaffold Wrapped with
Semi-Permeable Membrane and Tissue Cell Culture Using
Thereof

【출원인】

【명칭】 학교법인 연세대학교

【출원인코드】 2-1999-900090-0

【대리안】

【설명】 이세진

【대리인코드】 9-2000-000320-8

【포괄위임등록번호】 2001-070835-3

【대리인】

【설명】 김성남

【대리인코드】 9-1998-000150-9

【포괄적임을번호】 2001-070836-1

【발행자】

【설명이 구울포기】 김준현

【설명의 역할포기】 KIM Jung Hyun

【주민등록번호】 550708-1001310

【우편번호】 110-767

【주소】 서울특별시 종로구 명륜동 아남아파트 101-1801

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이혜원

【성명의 영문표기】 LEE, Hye Won

【주민등록번호】 760104-2069113

【우편번호】 137-042

【주소】 서울특별시 서초구 반포2동 한신1차아파트 6동 606호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최성욱

【성명의 영문표기】 CHOI, Sung Wook

【주민등록번호】 760112-1068815

【우편번호】 156-091

【주소】 서울특별시 동작구 사당1동 419-43 삼성아트빌라 401호

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사
를 청구합니다.

대리인 이세진 (인)

대리인 김성남 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 15 면 15,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 13 항 525,000 원

【합계】 569,000 원
【감면사유】 학교
【감면후 수수료】 284,500 원
【첨부서류】 1.요약서 · 명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 스캐폴드의 외벽에 반투막이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드와 적어도 하나 이상의 스캐폴드를 원하는 형태와 크기의 몰드에 정렬하는 단계 및 상기 몰드에 가교제 및 반투막제를 첨가하여 박투막제를 가교결합시켜 스캐폴드의 외벽에 반투막을 형성시키는 단계를 포함하는 반투막이 형성된 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

본 발명에 따르면, 반투과성 막이 형성된 스캐폴드는 외부의 영양분만을 스캐폴드의 내부로 이송시키고, 내부에서 발생된 노폐물만을 외부로 배출시킴으로써, 선택적으로 영양분을 공급할 수 있을 뿐만 아니라, 작은 크기의 스캐폴드를 서로 결합시켜 원하는 생체조직 모양을 형성하여 전체 스캐폴드에서 균일하게 조직세포가 증식되는 효과가 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

스캐폴드, 알지네이트, 생분해성 고분자, 반투막

【명세서】

【발명의 명칭】

외벽에 반투막이 형성된 생분해성 이중 다공성 스캐폴드 및 이를 이용한 조직세포 배양방법{Biodegradable Dual Porous Scaffold Wrapped with Semi-Permeable Membrane and Tissue Cell Culture Using Thereof}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 발포성 염을 이용한 염발포법에 의하여 제조되는 스캐폴드의 제조방법을 나타내는 흐름도,
- <2> 도 2는 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드의 제조방법을 나타내는 흐름도,
- <3> 도 3은 본 발명에 따른 스캐폴드의 표면을 나타내는 주사현미경 사진,
- <4> 도 4는 본 발명에 따른 스캐폴드의 내부 교차면을 나타내는 주사현미경 사진,
- <5> 도 5는 본 발명에 따른 스캐폴드의 실물을 나타내는 도,
- <6> 도 6은 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에서 증식하는 조직세포인 콘드로사이트를 나타내는 주사현미경 사진,
- <7> 도 7은 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에서 배양되는 콘드로사이트의 DNA 합성 결과를 나타내는 도,
- <8> 도 8은 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에서 배양되는 콘드로사이트의 글리코사미노글리칸합성 결과를 나타내는 도이다.

<9> 도 9는 누드 마우스에 이식한 본 발명에 따른 스캐폴드를 4주 후에 추출하여 헤마톡실린-에오신 염색시약, 매손-트라이크롬 염색시약, 그리고 알시안 블루 염색시약으로 처리한 후 결과를 나타낸 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 본 발명은 스캐폴드(scaffold) 및 이를 이용한 생체조직의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 생분해성 고분자를 이용하여 염발포법으로 다공성 스캐폴드를 제조한 뒤 상기 제조된 스캐폴드를 작은 조각으로 절단하고, 절단된 각각의 스캐폴드에 조직세포를 이식한 후 조직세포가 이식된 스캐폴드의 외부에 반투막을 형성시키고, 상기 반투막이 형성된 스캐폴드를 원하는 모양으로 가교결합시켜 생체조직을 재생하는 것에 관한 것이다.

<11> 여기서, 상기 스캐폴드는 세포에 의해 전이증식되는 다공성 구조를 갖는 생분해성 고분자 구조체를 의미한다.

<12> 일반적으로 연골은 한번 손상되면 자연적으로 재생되지 않는 조직으로서, 이러한 조직이 손상되게 되면 이를 치료하기 위하여 비흡수성 생체재료 등의 연골대체물을 이용하는 방법이 사용되어 왔다. 그러나, 지금까지 사용된 비흡수성 연골 대체물질들은 생체 내에서 피부괴사, 염증반응 등의 각종 부작용 및 합병증 등의 문제를 발생시켜 결국에는 자가연골이식이 가장 좋은 것으로 인정되고 있는 실

정이다.

<13> 하지만, 최근에 생명공학 분야 중에서도 손상된 생체조직의 일부를 실험실에서 제조하여 생체조직을 재건하는데 사용하려는 노력으로 인하여 조직공학(tissue engineering) 분야가 발달하였으며, 이러한 조직공학으로 정의되는 새로운 접근방법이 최근들어 많은 관심을 불러일으키고 있다.

<14> 상기, 조직공학은 기능적인 조직대등체를 만들기 위하여 생물조직과 특정 상호작용을 할 수 있는 생체적합물질의 신규생산을 개발하는 것을 포함하는데, 기초를 이루는 개념은 환자의 몸에서 필요한 조직을 채취하고 그 조직편으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양하여 필요한 양만큼 증식시키고, 증식된 세포를 다공성 구조를 가지는 생분해성 고분자로 이루어진 스캐폴드에 이식하여 일정기간 체외 배양한 뒤 이 세포/고분자 구조물을 다시 인체 내에 이식하는 것이다.

<15> 전술한 과정을 거친 후 세포들은 대부분의 조직이나 장기의 경우 신생 혈관이 형성될 때까지는 혈액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받아 인체내의 혈관이 자라 내부에 들어오면서 혈액의 공급이 이루어지면 세포들이 증식 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 스캐폴드는 그동안 분해되어 사리지게 된다.

<16> 이와 같이 인체 조직의 재생을 위해 사용되는 스캐폴드 재료의 주된 요건으로는 조직세포가 재료 표면에 유착하여 3차원적 구조를 가진 조직을 형성할 수 있도록 기질 또는 틀의 역할을 충분히 해내야 하고, 이식된 세포와 숙주 세포 사이에 위치하는 벽으로서의 역할도 담당해야 하는데, 이는 이식 후 혈액응고나 염증반응이 일어나지 않는 무독성의 생체적합성이 있어야 함을 의미한다.

<17> 또한, 이식된 세포가 충분히 조직으로서 본연의 기능과 역할을 수행하게 되면 원하는 시간에 따라 생체 내에서 완전히 분해되어 사라질 수 있는 생분해성을 지녀야 한다.

<18> 이러한 물리적 요건을 충족하면서 널리 사용되는 생분해성 고분자로는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산-글리콜산공중합체(PLGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르 및 이들의 공중합체가 현재 널리 사용되고 있다.

<19> 한편, 전술한 고분자 물질들을 다공성 구조로 만들기 위하여 여러 연구자들에 의해 연구되어 왔는데, 대표적인 것으로는 단결정 소금을 혼합하여 건조한 후 소금을 물에 용해시켜 내는 염 침출법 (solvent-casting and particulate-leaching technique: A. G. Mikos 등, *Polymer*, 35, 1068, 1994), CO_2 가스를 이용하여 고분자를 팽창시키는 가스 발포법 (gas foaming technique: L. D. Harris 등, *Journal of Biomedical Materials Research*, 42, 396, 1998), 고분자 섬유를 부직포로 만들어 고분자 메쉬(mesh)로 제조하는 방법 (fiber extrusion and fabric forming process: K. T. Paige 등, *Tissue Engineering*, 1, 97, 1995), 고분자 용액에 함유되어 있는 용매를 비용매속에 담궈 다공성을 만드는 상분리법 (thermally induced phase separation technique: C. Schugens 등, *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 449, 1996), 고분자 용액과 물을 혼합하여 유화 용액으로 제조한 후 액체 질소로 냉동시키고 동결 건조하는 유화 동결 건조법 (emulsion freeze-drying

method: K. Whang 등, Polymer, 36, 837, 1995) 등이 있다.

<20> 그러나, 상기한 종래의 제조방법들은 전반적으로 기공의 크기의 조절이 쉽지 않고 다공도가 비교적 낮으며 기공간 열린(open) 구조가 잘 형성되지 않는 경우가 있다. 또한, 이식된 조직세포를 증식할 경우 스캐폴드 표면의 다공성 공극이 막히는 막힘현상이 야기되어 비교적 복잡한 제조과정과 제조시 발생할 수 있는 가스 등의 유해 물질의 분비 및 스캐폴드내의 염의 잔존, 세포의 침투곤란 및 영양분 제공의 곤란함 등의 문제점이 있다.

<21> 한편, 전술한 다공성 구조를 가지는 생분해성 고분자로 이루어진 스캐폴드에 이식되는 조직세포는 계속적인 성장에 의하여 일련의 조직을 형성하게 되는데, 일반적인 생체조직의 재생은 재생하고자 하는 생체조직 형태로 스캐폴드 모양을 제조한 후, 상기 스캐폴드 내부에 조직세포를 이식하고, 이식된 조직세포를 성장시키는 방법을 이용하고 있다.

<22> 그러나, 전술한 방법은 영양분 및 산소가 스캐폴드의 내부 안쪽으로 용이하게 전달되지 못하고, 세포조직의 성장이 균일하지 않으며, 설령 스캐폴드의 두께가 매우 얇다 하여도 그 중심부까지 조직세포가 성장하는 것이 어렵다는 문제점 등이 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<23> 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위하여 도출된 것으로서, 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드를 제공한다.

<24> 또한, 본 발명은 스캐폴드 외벽에 알지네이트를 가교결합시켜 반투막을 형성시키는 방법을 제공한다.

<25> 또한, 본 발명은 스캐폴드를 작은 조각으로 절단하고, 절단된 각각의 스캐폴드에 조직세포를 이식한 후 재생하고자 하는 조직의 형상을 갖춘 몰드에 채우고, 스캐폴드가 채워져 있는 상기 몰드에 반투막제 및 가교제 혼합용액을 적가시켜 각각의 스캐폴드를 둘러싼 반투막제를 가교결합시켜 반투막을 형성시키고, 상기 반투막을 통하여 영양분을 공급하여 조직세포를 증식시키는 방법을 제공한다.

【발명의 구성】

<26> 한가지 관점에서, 본 발명은 스캐폴드의 외벽에 반투막이 형성된 것을 특징으로 한다.

<27> 다른 관점에서, 본 발명은 적어도 하나 이상의 스캐폴드를 원하는 형태와 크기의 몰드(mold)에 정렬하는 단계 및 상기 몰드에 가교제 및 반투막제를 첨가하여 반투막제를 가교결합시켜 스캐폴드의 외벽에 반투막을 형성시키는 단계를 포함하는 반투막이 형성된 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

<28> 또 다른 관점에서, 본 발명은 적어도 하나 이상의 스캐폴드에 재생하고자 하는 조직세포를 이식하는 단계; 조직세포가 이식된 스캐폴드를 원하는 형태와 크기의 몰드로 제조된 용기에 정렬하는 단계; 몰드로 제조된 용기에 반투막제 및 가교제를 첨가하여 상기 몰드로 제조된 용기에 채워져 있는 각각의 스캐폴드의 외벽에 반투막을 형성시켜 결합시키는 단계; 상기 가교제에 의하여 결합된 스캐폴드 내부

에 영양분을 공급하여 조직세포를 증식시키는 단계를 포함하는 생체조직의 제조방법을 제공한다.

<29> 본 발명에 따른 스캐폴드(scaffold)는 조직공학 또는 관련응용분야용 세포운반체로서 디자인된 것으로, 대부분 스펜지 형태로 이루어져 있으며, 바람직하게는 세포에 의해 전이증식되는 다공성 구조를 갖는 생분해성 고분자 구조체를 의미하고, 흔히 생분해성을 갖는 "고분자 지지체"로 호칭되기도 한다.

<30> 특히, 전술한 다공성은 판상 세공벽 내에서 발견되는 공간, 중합체의 각 주 사이의 공간을 지칭하는 세공을 다수 포함하고 있는 것을 의미하며, 상기 세공의 크기는 200 내지 $350\mu\text{m}$ 크기, 바람직하게는 230 내지 $270\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는다.

<31> 또한, 상기 세공은 미세세공을 포함하는데 전술한 미세세공은 스캐폴드의 벽면에 분포되는 것으로, 그 크기가 $2\mu\text{m}$ 이하인 것을 의미하게 된다.

<32> 한편, 본 발명에 따른 스캐폴드는 조직세포를 이식하여 성장시킬 수 있는 장소를 제공하는 것이라면 어느 것을 사용하여도 무방하며, 당업자 사이에 널리 사용되는 것이라면 통상적으로 어떠한 스캐폴드라도 사용할 수 있다.

<33> 이러한 스캐폴드를 제조하는 방법의 일례로서, 본 발명에서는 단결정 소금을 혼합하여 건조한 후 소금을 물에 용해시켜 내는 염 침출법, 이산화탄소 가스를 이용하여 고분자를 팽창시키는 가스 발포법, 고분자 섬유를 부직포로 만들어 고분자 폐쉬로 제조하는 방법, 고분자 용액에 함유되어 있는 용매를 비용매속에 담궈 다공성을 만드는 상분리법 또는 고분자 용액과 물을 혼합하여 유화 용액으로 제조한 후 액체 질소로 냉동시키고 동결 건조하는 유화 동결 건조법 등을 사용할 수 있으며,

추천하기로는 발포성 염을 고분자에 용해시켜 스캐폴드를 제조하는 염발포법이 좋다.

<34> 이에, 하기 설명은 염발포법을 이용하여 제조된 스캐폴드를 위주로 하여 설명하기로 한다.

<35> 본 발명에 따른 스캐폴드를 제조하기 위한 재료는 인체에 독성이 없고, 인체에 결합되었을 경우 부작용을 유발하지 않으면서 대사과정에서 생분해되는 생분해성 고분자 물질 예를 들면, 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리- ϵ -카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르 및 이들의 공중합체 등이라면 어느 것을 사용하여도 무방하며, 바람직하게는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA)이 좋고, 더욱 바람직하게는 분자량이 90,000 내지 12,6000Da인 폴리락트산-글리콜산공중합체(PLGA)가 좋다.

<36> 본 발명에 따른 스캐폴드를 제조하기 위한 발포성 염은 제조되는 스캐폴드의 공극의 크기를 조절하는 것으로서, 사용 가능한 물질로는 암노늄 하이드로겐 카보네이트(NH_4HCO_3), 암모늄 카보네이트($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), 소듐 하이드로겐 카보네이트(NaHCO_3) 또는 소듐 카보네이트(Na_2CO_3) 등이 있다.

<37> 본 발명에 따른 유기용매는 상기 생분해성 고분자 물질이 용해되어 높은 점성의 고분자 용액을 만들 수 있는 것이라면 어느 것을 사용하여도 무방하며, 예를 들면, 디메틸설피사이드(DMSO), 아세토니트릴(CH_3CN), 디메틸포름아마이드(DMF), N-

메틸페롤리돈 등과 메틸렌클로라이드(CH_2Cl_2), 클로로포름(CHCl_3), 아세톤, 아세트산(CH_3COOH), 테트라하이드로퓨란(THF), 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤(MEK), 다이옥산 또는 다이옥산/물 등의 혼합용액을 사용할 수 있는데, 추천하기로는 디메틸설폐사이드와 메틸렌클로라이드 혼합용액을 사용하는 것이 좋다.

<38> 여기서, 상기 디메틸설폐사이드와 메틸렌클로라이드 혼합용액을 이용하여 스캐폴드를 제조할 경우, 상기 혼합용액 중 디메틸설폐사이드의 비율이 낮을 수록 작은 미세세공 형성이 가능하며, 상기 메틸렌클로라이드만을 단독으로 하여 용매로 사용한 경우에는 미세세공은 형성되지 않는다.

<39> 한편, 본 발명에 따른 스캐폴드는 생체조직의 재생을 위하여 반투막에 싸인 상태에서 조직세포의 성장처를 제공하게 되는데, 여기서 반투막이라 함은 반투막제의 가교결합에 의하여 생성되는 반투과성 막을 의미한다.

<40> 이와 같은 반투막은 조직세포가 이식된 스캐폴드의 외벽에 형성되어 선별적으로 외부로부터 스캐폴드의 내부로 영양분을 공급하고, 조직세포의 대사과정에 의하여 발생한 노폐물을 스캐폴드의 외부로 배출하는 기능을 수행하며, 상기 반투막은 반투막제와 가교제의 반응에 의한 가교결합에 의하여 형성되는데, 상기 반투막제로 사용 가능한 물질은 전술한 반투막의 기능을 수행할 수 있는 것이라면 어느 것 예를 들면, 알지네이트(alginate), 폴리사카라이드(polysaccharide)류, 키토산(chitosan), 아가파우더(agar powder), 젤라틴(gelatin) 등을 사용하여도 무방하지만, 바람직하게는 알지네이트를 사용하는 것이 좋다.

<41> 여기서, 상기 알지네이트는 소듐 알지네이트 등과 같은 알기닉 산(alginic acid)의 염으로서, 고분자사슬에서 다양한 배열로 존재하는 β -D-메누로닉산(β -D-mannuronic acid) 및 α -L-글루로닉산(α -L-gluronic acid)의 공중합체 계열이다.

<42> 또한, 상기 알지네이트는 생체적합성을 지니고 있으며, 이러한 생체적합성으로 인하여 농축제나 에멀젼화제 등으로 식품산업에 널리 사용되고 있고, 더 나아가서 고분자필름, 연고, 외과용 거즈 등의 생물공학관련 분야에 사용되고 있으며, 면역보호(immunoprotection)의 방법으로서 생세포를 캡슐화하는 젤 비드(beads)로 사용되고 있다[P. Aebischer et al. Transplantation in humans of encapsulated xenogeneic cells without immunosuppression: a preliminary report, Transplantation, 58, 1275-1277(1994). P. De Vos et al. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets, Diabetologia 40, 262-270(1997). G. Klock et al. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation, Appl. Microbiol. Biotechno. 40, 638-643(1994).].

<43> 또한, 상기 알지네이트는 수용성이며, 2가의 양이온 용액 예를 들면, 칼슘 클로라이드 등의 가교제에 의하여 가교결합을 하게 된다. 이때, 상기 칼슘이온은 안정한 알지네이트 젤을 형성하기 위하여 알지네이트 사슬의 글루로닉산(gluronic acid)의 위치에 결합된다.

<44> 특히, 상기 2가의 양이온 용액에 의해 수행되는 신속한 결화속도는 가교결합

의 밀도 및 젤 비드에 따른 고분자 농도 정도에 영향을 받게 되는데, 일반적으로 반투막제 및 가교제의 농도가 진할수록 그리고 반응시간이 장시간 걸릴수록 반투막의 경화 정도가 높게 나타난다. 그러므로, 본 발명에 따른 반투막제의 농도는 0.5 내지 5% 범위로, 바람직하게는 1 내지 2%, 더욱 바람직하게는 1.5%로 조절하여 사용하고, 가교제의 농도는 1 내지 5% 범위, 바람직하게는 1 내지 2%, 더욱 바람직하게는 1.1%로 사용하는 것이 좋으며, 반응시간은 1 내지 20분, 바람직하게는 5 내지 10분이 좋다.

<45> 한편, 상기 β -D-메누로닉산(β -D-mannuronic acid) 및 α -L-글루로닉산(α -L-gluronic acid)의 농도(β -D-메누로닉산/ α -L-글루로닉산의 비)는 생체적합성의 특성 및 구조 변화에 영향을 미치게 되며, 세포에 독성이 적고, 혈액과 접촉하게 되면 적혈구의 파괴를 감소시키게 된다[P. De Vos, B. De Haan, R. Van Schilfgaarde. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules, Biomater. 18, 273-278(1997). D. Joseph et al. The biomedical engineering handbook, CRC Press, IEEE Press, 1788-1806(1995).].

<46> 본 발명에 따른 반투막을 형성시키기 위한 가교제는 일차적으로 반투막을 형성시키는 동시에 1 내지 3mm, 바람직하게는 1.5 내지 2.5mm의 크기로 제조한 스캐폴드를 서로 결합시켜 상기 스캐폴드를 재생하고자 하는 생체조직의 형태를 이루도록 하기 위해 사용되는 것으로서, 전술한 스캐폴드의 표면에 묻어있는 박투막제를 가교결합시켜 젤화함으로써 각각의 스캐폴드를 결합시킨다. 이러한 기능을 수행하

는 가교제로 사용 가능한 물질은 칼슘 클로라이드, 트리폴리포스페이트, 글루타알
데하이드 등이 있으며, 바람직하게는 칼슘 클로라이드를 사용하는 것이 좋다.

<47> 전술한 구성을 갖는 본 발명에 따른 스캐폴드 및 스캐폴드를 이용한 생체조
직 재생방법을 설명하면 다음과 같다.

<48> 먼저, 일례로서 염발포법을 이용한 스캐폴드의 제조방법을 설명한 다음 상기
염발포법으로 제조된 스캐폴드를 이용한 반투막이 형성된 스캐폴드의 제조방법에
대하여 설명하기로 한다.

<49> 도 1은 발포성 염을 이용한 염발포법에 의하여 제조되는 스캐폴드의 제조방
법을 나타내는 흐름도, 도 2는 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드의
제조방법을 나타내는 흐름도로서 함께 설명한다.

<50> 스캐폴드의 제조

<51> 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 스캐폴드는

<52> i) 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시켜 높은 점성을 가진 고분자 용액
을 제조하는 단계;

<53> ii) 발포성 염을 고분자 용액에 혼합하여 고분자/유기용매/염이 혼합된 고분
자 겔을 제조하는 단계;

<54> iii) 고분자 겔을 원하는 형태와 크기의 몰드로 성형하는 단계;

<55> iv) 고분자/염/유기용매가 혼합된 고분자 겔에서 유기용매를 제거하는 단계;

<56> iv) 고분자/염의 혼합물에서 염을 용매에 침지시켜 침출 및 발포시키는 단계; 및

<57> iv) 세척하는 단계

<58> 를 포함한다.

<59> 여기서, 최종적으로 제조되는 스캐폴드는 생체조직의 재생을 위하여 1 내지 3mm, 바람직하게는 1.5 내지 2.5mm의 크기로 절단되어 사용되는데, 이는 제조되는 스캐폴드를 초기부터 재생하고자 하는 생체조직의 형태에 어울리는 크기로 제조하는 기준의 업-다운(Up-down) 방식이 아닌 작은 크기의 스캐폴드를 원하는 생체조직의 모양으로 정렬한 후 조직세포를 증식시키는 바텀-업(bottom-up) 방식으로 생체조직을 재생하기 위함이다.

<60> 한편, 전술한 방법으로 제조된 스캐폴드는 이중 다공성 구조를 가지며 기계적 물성이 향상되어 스캐폴드 내의 조직세포의 분포가 균일하게 유지될 수 있도록 한다.

<61> 특히, 상기 이중 다공성 구조를 구성하는 세공 및 미세세공의 경우, 사용되는 유기용매의 비율을 조절하고 일정 크기를 갖는 세공형 고체 입자를 사용하여 세공 및 미세세공을 구성한다.

<62> 이에, 본 발명에 따른 스캐폴드의 이중 다공성 구조의 제조방법을 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.

<63> 먼저 스캐폴드에 미세세공을 형성하기 위해 단계 i)의 유기용매로 디메틸설포사이드와 메틸렌클로라이드를 비율별로 혼합한 후 생분해성 고분자를 용해시키

고, 세공을 형성하기 위해 일정한 크기를 가진 세공형성 고체 입자 예를 들면, 암모늄 하이드로겐 카보네이트, 암모늄 카보네이트, 소듐 하이드로겐 카보네이트 또는 소듐 카보네이트를 혼합한다.

<64> 그 다음, 상기 혼합물로부터 메틸렌클로라이드를 휘발시킨 후 상기 혼합물을, 에탄올, 메탄올 또는 이들의 혼합물에 넣어 디메틸설폭사이드를 용출시킨다.

<65> 이때, 상기 디메틸설폭사이드를 용출되며 스캐폴드 상에 미세세공이 형성된다.

<66> 한편, 상기 디메틸설폭사이드의 비율이 낮을수록 작은 미세세공 형성이 가능하며, 상기 메틸렌클로라이드만을 용매로 사용한 경우에는 미세세공은 형성되지 않는다. 특히, 상기 디메틸설폭사이드 5%와 메틸렌크로라이드 95%의 용매를 사용한 경우에 약 $10\mu\text{m}$ 의 미세세공이 형성되며, 디메틸설폭사이드 1%와 메틸렌클로라이드 99%의 용매를 사용한 경우에는 약 $2\mu\text{m}$ 의 미세세공이 형성된다.

<67> 또한, 상기 디메틸설폭사이드와 대치되어 사용될 수 있는 용매로는 아세토니트릴(CH_3CN), 디메틸포름아마이드(DMF), N-메틸피롤리돈(NMP)등이 있다.

<68> 외부 표면에 반투막이 형성된 스캐폴드의 제조방법

<69> 전술한 스캐폴드의 제조방법에 의하여 제조된 스캐폴드를 이용하여 반투막을 포함하는 스캐폴드를 제조하는 방법은 도 2에 도시된 바와 같이,

<70> i) 적어도 하나 이상의 스캐폴드 각각에 재생하고자 하는 조직세포를 이식

하는 단계;

<71> ii) 조직세포가 이식된 스캐폴드를 원하는 형태와 크기의 몰드로 제조된 용기애 정렬하는 단계; 및

<72> iii) 조직세포를 포함한 각각의 스캐폴드가 정렬된 목적 생체조직의 형태로 제조된 용기에 반투막제를 첨가한 후 가교제를 이용하여 상기 반투막제를 가교결합시켜 상기 몰드로 제조된 용기에 채워져 있는 각각의 스캐폴드를 결합시키는 단계

<73> 를 포함한다.

<74> 여기서, 상기 단계 iii)에서 수행되는 가교제 및 알지네이트 혼합용액은 필요에 따라서, 완충용액을 더 첨가하여 사용할 수 있다.

<75> 한편, 상기 단계 iii)의 반투막제는 0.5 내지 5%, 바람직하게는 1 내지 2%, 보다 바람직하게는 1.5%의 농도로, 가교제는 1 내지 5%, 바람직하게는 1 내지 2%, 보다 바람직하게는 1.1%의 농도로 사용하는 것이 좋고, 반응시간은 1 내지 20분, 바람직하게는 5 내지 10분 동안 가교결합시키는 것이 좋다.

<76> 전술한 스캐폴드를 이용하여 제조된 반투막이 형성된 스캐폴드를 이용한 생체조직의 제조방법을 설명하면 다음과 같다.

<77> 본 발명에 따른 반투막이 형성된 스캐폴드를 이용하여 생체조직을 재생하기 위해서는 먼저 제조된 스캐폴드를 1 내지 3mm, 바람직하게는 1.5 내지 2.5mm의 크기로 절단하여 다수개의 스캐폴드를 준비한 다음, 상기 준비된 각각의 스캐폴드에 재생하고자 하는 조직세포를 각각 이식시킨다.

<78> 그 다음, 각각의 조직세포가 이식된 스캐폴드를 반투막제와 혼합한 후 이를 재생하고자 하는 생체조직의 모양으로 만들어 놓은 몰드에 정렬하여, 작은 스캐폴드 조각으로 재생하고자 하는 생체조직 모양을 형성시킨다.

<79> 그 다음, 상기 스캐폴드를 포함한 몰드에 가교제를 천천히 첨가하여 상기 스캐폴드 외부에 반투막제를 가교결합시켜 그 표면에 반투막을 형성시킨다.

<80> 그 다음, 상기 외부에 반투막이 형성된 스캐폴드에 배양액을 넣어 상기 반투막이 형성된 스캐폴드 내부에 존재하는 조직세포를 성장시킨다.

<81> 이때, 상기 반투막은 상기 스캐폴드의 내부의 조직세포의 대사과정에서 발생하는 노폐물을 외부로 배출하고, 외부에 존재하는 영양분 및 산소를 스캐폴드 내부로 선택적으로 통과시키게 된다.

<82> 한편, 상기 반투막을 통과한 영양분 및 산소는 스캐폴드의 표면에 형성되어 있는 세공을 통하여 조직세포로 이송되게 되며, 이러한 과정을 통하여 조직세포는 상기 스캐폴드 전체에 걸쳐 균일하게 성장하여 생체조직을 재생하게 된다.

<83> 본 발명에 따른 외부에 반투막이 형성된 스캐폴드는 조직공학용 3차원 세포 배양의 분야 예를 들면, 조직재생, 장기재생 등의 공정에 적용될 수 있으며, 그러한 예로서, 연골 재생용 세포배양 구조물, 뼈 조직 재생용 세포배양 구조물, 혈관 재생용 튜블러(tubular) 구조의 세포배양 구조물, 신경 재생용 튜블러 구조의 세포 배양 구조물, 손상조직 재생을 위한 세포배양 구조물, 다공성 고분자막 및 줄기 세포를 이용한 장기(심장, 폐, 간 등) 재생용 세포배양 구조물 등으로 활용될 수 있

다.

<84> 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하기로 한다. 그러나 하기의 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<85> <실시예 1>

<86> 스캐폴드의 제조.

<87> 메틸클로라이드[덕산화학, 대한민국] 90%와 디메틸실록사이드[Sigma, 미국] 10%의 혼합용액에 분자량이 90,000 내지 12,6000이고 락트산(lactic acid)[Sigma, 미국]과 글리콜산(glycolic acid)[Sigma, 미국]을 75:25의 중량비로 한 PLGA을 용매기준 무게 비율로 10%로 용해시켰다.

<88> 그 다음, 제조된 상기 혼합용액의 중량비 9:1로 하여 150 내지 250 μ m의 입자 크기를 갖는 암모늄 하이드로겐 카보네이트[Junsei Chemical Co. Ltd. 일본]를 혼합한 뒤 교반하고, 상기 교반된 혼합물을 직경이 100mm의 직경을 갖는 실러더 타입의 살레(schale)[동성과학, 대한민국]에 부었다.

<89> 그 다음, 상기 살레[동성과학, 대한민국]에 채워져 있는 혼합용액에 포함되어 있는 메틸 클로라이드[덕산화학, 대한민국]를 부분적으로 증발시켜 반고체화된 시료(semi-solidified sample)로 제조하였다.

<90> 그 다음, 상기 반고체화된 시료를 거품이 발생하지 않을 때까지 30%의 아세

트 산(acetic acid) 및 에탄올이 채워져 있는 용기에 담궈 시료를 제조하였다.

<91> 그 다음, 상기 시료를 증류수로 3시간 동안 세척한 후 건조기에서 수일간 건조시켜 스캐폴드를 제조하였다.

<92> 제조된 스캐폴드의 직경은 100mm였으며, 두께는 1mm였으며, 상기 스캐폴드를 주사현미경(SEM)[JSM-5410LV, Jeol, 일본]으로 측정하여 도 3 내지 도 4로 나타냈으며, 그 실물을 도 5로 나타냈다.

<93> 여기서, 도 3은 본 발명에 따른 스캐폴드의 표면을 나타내는 주사현미경(SEM) 사진, 도 4는 본 발명에 따른 스캐폴드의 내부 교차면을 나타내는 주사현미경(SEM) 사진, 도 5는 본 발명에 따른 스캐폴드의 실물을 나타내는 도이다.

<94> 한편, 상기 도 3으로 스캐폴드 표면에 세공이 형성됨을 확인할 수 있었으며, 상기 도 4는 스캐폴드 내부 교차면에 세포를 접종(seeding)하기 위한 미세세공이 형성되고, 상기 미세세공이 서로 연결되어 있음을 확인하였다.

<95> <실시예 2>

<96> 생체조직의 재생

<97> i) 스캐폴드에 조직세포 접종

<98> 실시예 1에 의하여 제조된 스캐폴드를 직경 2mm, 두께 1mm로 절단한 후 상기 절단된 스캐폴드에 토끼(rabbit)로부터 분리한 콘드로사이트(chondrocytes) 1.0×10^6 cells/ml를 접종하였다.

<99> 그 다음, 온도 37°C에서 5%의 이산화탄소농도를 갖는 습한 분위기에서 약 3시간 동안 서로 볼도록 방치한 뒤 4ml의 항균/항진성용액과 FBS[Sigma, 미국]를 포함하는 DMEM[JBI, 대한민국]를 첨가한 후 3일 동안 배양하였다.

<100> ii) 스캐폴드의 외벽에 반투막 형성 및 조직세포 증식

<101> 3%의 농도의 소듐 알기닉 액시드[Sigma, 미국]가 포함된 용액에 소듐알기닉 액시드 혼합 용액과 동일한 양의 DMEM[JBI, 대한민국](4ml의 항균/항진성용액과 FBS[Sigma, 미국]를 포함)을 첨가하여 혼합하였다.

<102> 그 다음, 상기 혼합물을 상기 i)에 의하여 콘드로사이트가 접종된 스캐폴드를 포함하는 50ml의 튜브[Nunc, 미국]에 부은 후 수회에 걸쳐 피펫팅(pipetting)하여 혼합한 뒤 상기 스캐폴드를 목적 생체조직의 형태를 가지는 테프론 몰드로 이송시켰다.

<103> 그 다음, 상기 테프론 몰드에 가교제로서 칼슘 클로라이드 용액과 pH 7.4인 HEPES (n-2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesufonic acid])[Sigma, 미국] 완충용액을 혼합하여 21G 주사기로 상기 혼합용액을 천천히 첨가하여 결화시켰다.

<104> 그 다음, 상기 결화되어 비드(bead) 형태로 제조된 스캐폴드를 완전히 결화시키기 위하여 칼슘 클로라이드 용액에 5분 동안 담지시킨 뒤 PBS[Sigma, 미국]로 세척하고, 4ml의 항균/항진성용액과 FBS[Sigma, 미국]를 포함하는 DMEM[JBI, 대한민국]이 채워져 있는 6개의 웰 플레이트로 이송시켰다.

:105> <실험>

:106> 세포증식 테스트

:107> 실시예 3에 의하여 제조된 비드(bead)를 온도 37°C와 5%의 이산화탄소 농도를 갖는 습한 분위기에서 90rpm 교반기(shaker)의 속도로 배양하며, 3 내지 4일 간격으로 배지를 교체하였다. 그 다음, 7, 14, 21, 31 동안 상기 콘드로사이트 증식을 주사현미경(SEM)[S-800, Hitachi, 일본]으로 측정하고, DNA 양을 발광(fluorescence)[Luminescence Spectrometer LS50B, PERKIN ELMER, 영국]을 이용하여 측정하였다.

<108> 그 결과를 도 6 내지 도 8로 나타냈다.

<109> 여기서, 도 6은 본 발명에 따른 반투막이 형성된 스캐폴드에서 증식하는 조직세포인 콘드로사이트를 나타내는 주사현미경 사진, 도 7은 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에서 배양되는 콘드로사이트의 DNA 합성 결과를 나타내는 도, 도 8은 본 발명에 따른 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에서 배양되는 콘드로사이트의 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)합성 결과를 나타내는 도이다.

<110> 한편, 상기 도 6에서,

<111> (a)는 7일간 배양한 스캐폴드의 표면 사진,

<112> (b)는 7일간 배양한 스캐폴드내의 교차면의 사진,

<113> (c)는 14일간 배양한 스캐폴드의 표면 사진,

<114> (d)는 21일간 배양한 스캐폴드의 표면 사진,

<115> (e)는 31일간 배양한 스캐폴드의 표면 사진이며,

<116> 도 8에서 글리코사미노글리칸의 분비는 콘드로사이트가 연골의 기능을 가지면서 정상적으로 증식되고 있다는 것을 나타내는 것으로 사료된다.

<117> 그러므로, 스캐폴드의 표면은 물론 스캐폴드 내부에서도 콘드로사이트가 원활하게 활성을 가지면서 증식되고 있음을 알 수 있었다.

<118> 동물 이식 테스트

<119> 상기 ii)에 의한, 콘드로사이트가 접종되어 있는, 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드를 누드 마우스의 등부위 표피밑에 이식하여 체내에서의 세포증식 양상을 관찰하였고, 그 결과를 도 9로 나타냈다.

<120> 도 9는 누드 마우스에 이식한, 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드를 4주후에 추출하여 각각 헤마톡실린-에오신 염색시약, 매손-트라이크롬 염색시약, 그리고 알시안 블루 염색시약으로 처리한 후 그 결과를 나타내는 사진이다.

<121> 여기서, H&E는 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색시약으로 처리한 결과를, M&E는 매손-트라이크롬(masson-trichrome) 염색시약으로 처리한 결과를, (Alcian Blue)는 알시안 블루(Alcian Blue) 염색시약으로 처리한 결과를 의미한다.

<122> 도 9에 도시된 바와 같이 외벽에 반투막이 형성된 스캐폴드에 접종된 콘드로사이트가 체내에서도 정상적으로 증식하고 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<123>

본 발명에 따른 반투과성 막이 형성된 스캐폴드는 외부의 영양분만을 스캐폴드의 내부로 이송시키고, 내부에서 발생된 노폐물만을 외부로 배출시킴으로써, 선택적으로 영양분을 공급할 수 있을 뿐만 아니라, 작은 크기의 스캐폴드를 서로 결합시켜 원하는 생체조직 모양을 형성하여 전체 스캐폴드에서 균일하게 조직세포가 증식되는 효과가 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

조직세포를 이식한 후 성장시켜 생체조직을 재생시키는 스캐폴드에 있어서, 상기 스캐폴드의 외벽에 반투막이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 반투막이 알지네이트, 폴리사카라이드류, 키토산, 아가파우더 또는 젤라틴 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 스캐폴드가 1 내지 3mm의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드.

【청구항 4】

적어도 하나 이상의 스캐폴드를 원하는 형태와 크기의 몰드에 정렬하는 단계;

상기 몰드에 가교제 및 반투막제 혼합용액을 첨가하여 반투막제를 가교결합시켜 스캐폴드의 외벽에 반투막을 형성시키는 단계를 포함하는 반투막을 포함하는 스캐폴드의 제조방법.

【청구항 5】

제 4항에 있어서,

상기 반투막제가 알지네이트, 폴리사카라이드류, 키토산, 아가파우더 또는
겔라틴 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드의 제조방
법.

【청구항 6】

제 4항에 있어서,

상기 가교제가 칼슘 클로라이드, 트리폴리포스페이트 또는 글루타알데하이드
중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스캐폴드의 제조방법.

【청구항 7】

제 4항에 있어서,

상기 몰드가 테프론으로 이루어진 것을 특징으로 하는 반투막을 포함하는 스
캐폴드의 제조방법.

【청구항 8】

적어도 하나 이상의 스캐폴드에 재생하고자 하는 조직세포를 이식하는 단계;
조직세포가 이식된 스캐폴드로 원하는 형태와 크기의 몰드로 제조된 용기에
정렬하는 단계;

몰드로 제조된 용기에 가교제 및 반투막제를 첨가하여 상기 몰드로 제조된
용기에 채워져 있는 각각의 스캐폴드의 외벽에 반투막을 형성시켜 결합시키는 단
계; 및

상기 가교제에 의하여 결합된 스캐폴드 내부에 영양분을 공급하여 조직세포를 증식시키는 단계를 포함하는 생체조직의 제조방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

상기 반투막제가 알지네이트, 폴리사카라이드류, 키토산, 아가파우더 또는 젤라틴 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 생체조직의 제조방법.

【청구항 10】

제 8항에 있어서,

상기 가교제가 칼슘 클로라이드, 트리폴리포스페이트 또는 글루타알데하이드 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 생체조직의 제조방법.

【청구항 11】

제 8항에 있어서,

상기 몰드가 테프론으로 이루어진 것을 특징으로 하는 생체조직의 제조방법.

【청구항 12】

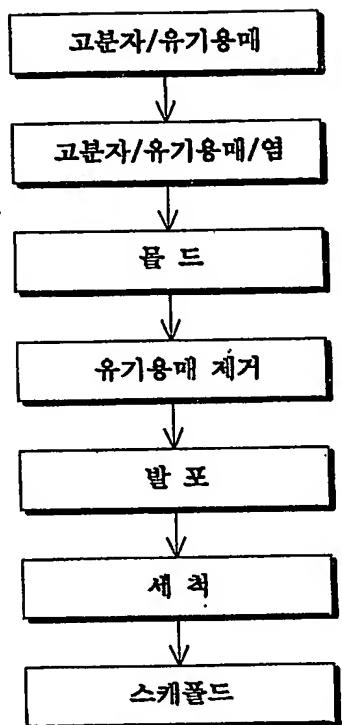
제 1항 내지 제 3항에 따른 반투막을 포함하는 스캐폴드에 의하여 제조된 생체조직.

【청구항 13】

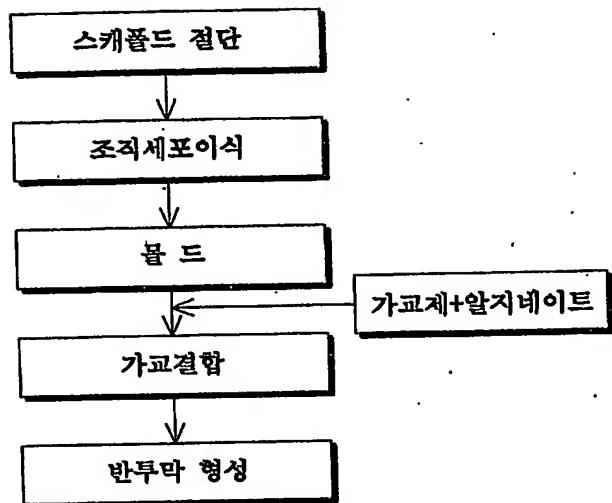
제 8항 내지 11항에 따른 생체조직의 제조방법에 의하여 제조된 생체조직.

【도면】

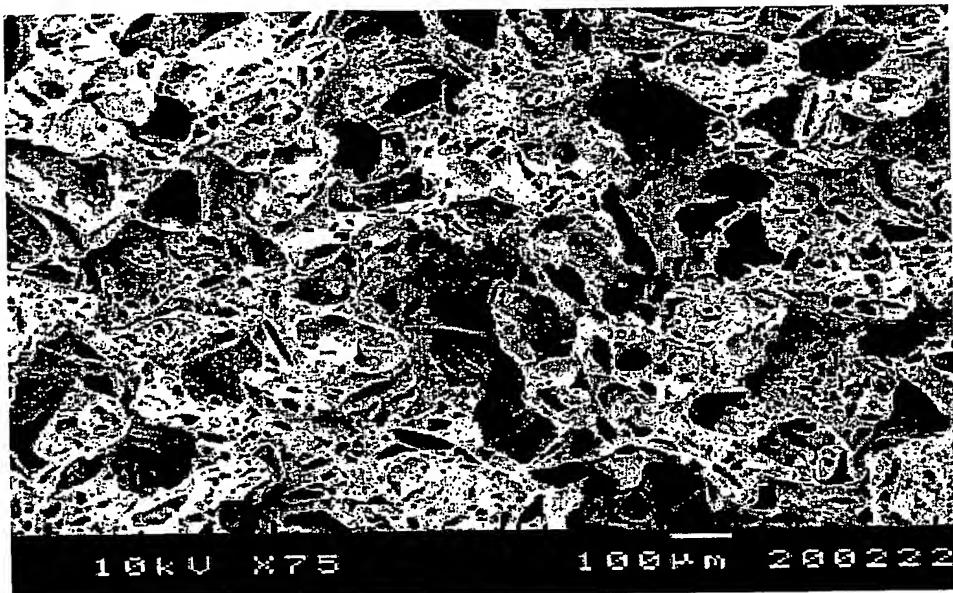
【도 1】



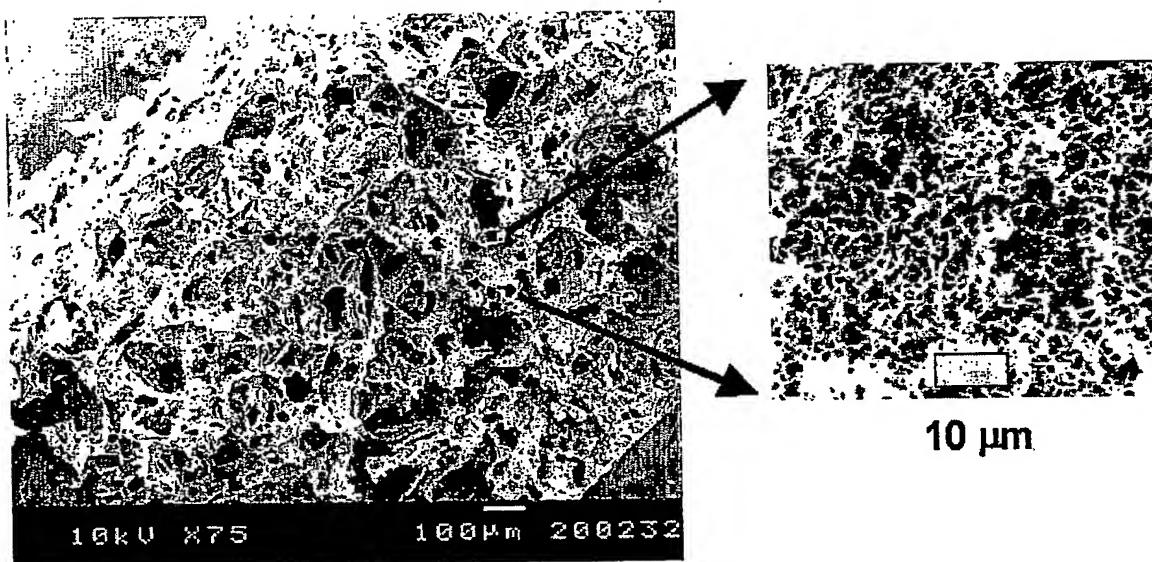
【도 2】



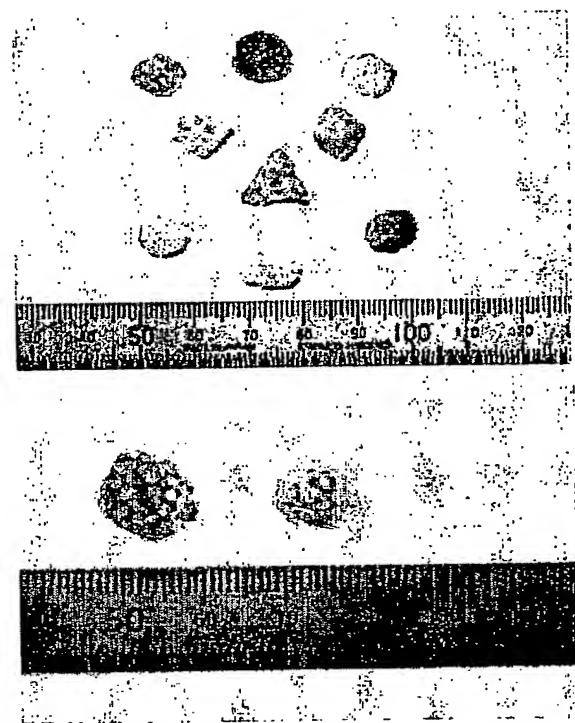
【도 3】



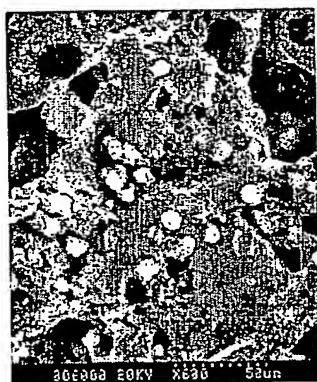
【도 4】



【도 5】



【도 6】



(a)

(b)

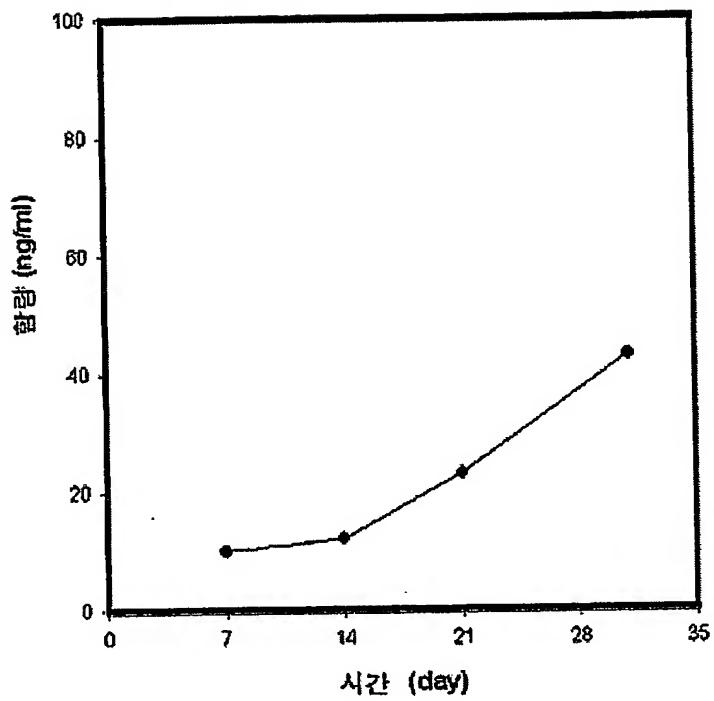
(c)



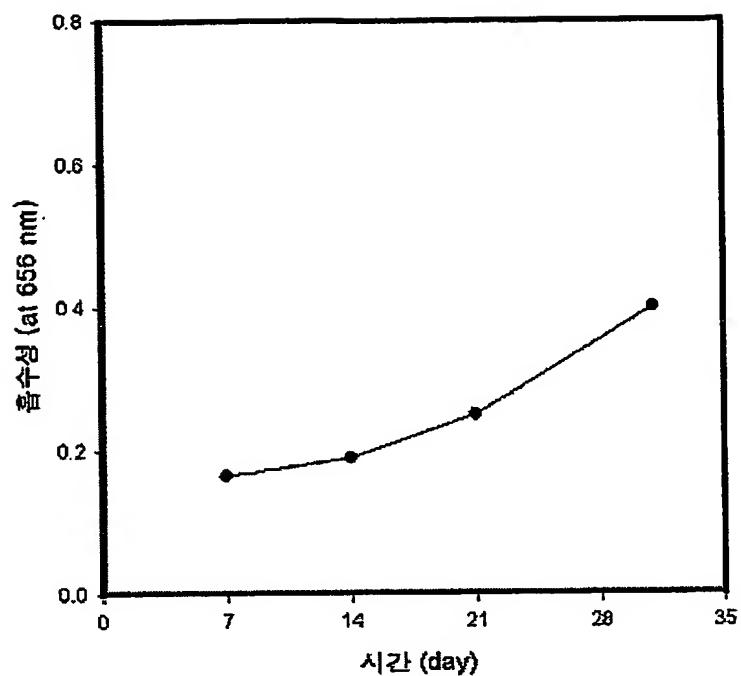
(d)

(e)

【도 7】



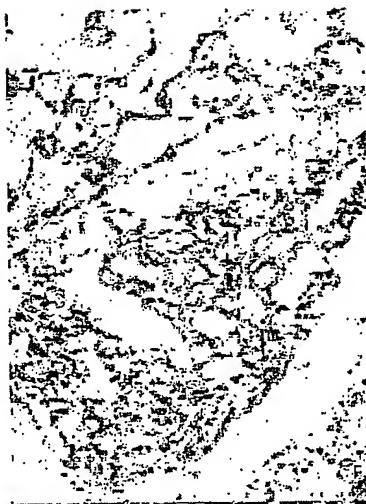
【도 8】



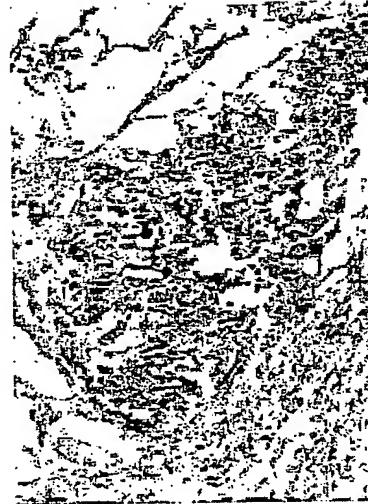
【도 9】



H&E



M&T



Alcian Blue